

答 弁 書

特許庁審査官 前田 憲彦 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JP03/04308

2. 出 願 人

名 称 株式会社 島津製作所

SHIMADZU CORPORATION

あて名 〒604-8511 日本国京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
1, Nishinokyo-Kuwabaracho,
Nakagyo-ku, Kyoto-shi,
Kyoto 604-8511 JAPAN

国 籍 日本国 Japan

住 所 日本国 Japan

3. 代 理 人

氏 名 (10056) 弁理士 岡田 正広



OKADA Masahiro

あて名 〒540-0010 日本国大阪府大阪市中北区材木町1番6号
第12新興ビル10階 岡田正広特許事務所
OKADA & CO.
12th Shinko Bldg. 10F,
1-6, Zaimoku-cho, Chuo-ku,
Osaka-shi, Osaka 540-0010 JAPAN

4. 通知の日付 10. 2. 2004

5. 答弁の内容

(1) 見解は、本件請求の範囲10-45は、新規性を有するが、本件請求の範囲1-9は、文献1-7を引用の上、新規性がないとし、且つ、本件請求の範囲1-45は、文献1-9を引用の上、進歩性がないとしたものである。

しかしながら、少なくとも本件請求の範囲10、20及び32は、進歩性を有していると考えるので、以下に答弁する。

(2) 本件請求の範囲32に係る発明は、「前記式(1)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物が、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬を用いるペプチドの解析法。」である。

(3) 一方、文献1-7は、同位体標識されたスルフェニルクロリドを開示する。このうち、文献1、5及び7は、同位体標識されたアリールスルフェニルクロリドを開示する。文献8は、タンパク質を同位体標識試薬によりラベル化し、これを質量分析することによりタンパク質の定量分析を行う方法を開示する。文献9は、タンパク質のトリプトファン残基の特異的修飾剤としてアリールスルフェニルクロリドを開示する。審査官は、これら文献の記載を組み合わせることにより、本願発明は当業者が容易に想到し得るとの見解である。

文献8は、質量分析を用いたタンパク質の定量分析方法について記載している。文献8の方法においては、親和性標識「A」に、リンカー基「L」と、反応基「PRG」とが結合した、3つの部分からなる試薬「A-L-PRG」が用いられている。A部分は、試薬が結合したペプチドを単離することを可能にする。L部分は、同位体標識されることによりペプチドの定量を行うことを可能にする。PRG部分は、選択的にタンパク質中の特定の部位をタグ化することを可能にする。すなわちタンパク質中の修飾すべき特定の残基を決定するのは試薬のPRG部分である。

質量分析によるタンパク質の定量解析を行うためには、用いるラベル化試薬にこれら3つの機能が全て備わっていることが必須である。すなわち、特定の残基を修飾することができる部分PRGのみでなく、さらに親和性標識Aとリンカー基Lが備わっていないと、質量分

析によるタンパク質の定量分析は成し得ない。

文献9には、アリールスルフェニルクロリドがトリプトファン残基を特異的に修飾することができることが開示されている。しかしながら、文献9に開示されているのは、アリールスルフェニルクロリドがトリプトファン残基という特定の残基を修飾することができるということのみであって、アリールスルフェニルクロリドの、質量分析によるタンパク質の定量分析への適用の可能性については何ら開示・示唆がない。また、文献9にはアリールスルフェニルクロリドについての上記3つの機能に関しても、もちろん開示・示唆がない。

従って、アリールスルフェニルクロリドを、文献8に示される質量分析によるタンパク質の定量分析に適用することは容易ではない。このことから、文献1-9を組み合わせる本発明に想到することは容易ではない。

これに対して、本発明者らは、トリプトファンに着目して、本件請求の範囲32に係る発明を完成させた。

次に、本件請求の範囲32に係る発明の効果について述べる。

文献8においては、タンパク質反応性基PRGが反応するタンパク質中の官能基として、スルフヒドリル基(すなわちシステイン残基)、アミノ基、カルボキシレート基、エステル基、ホスフェート基、アルデヒド及び/又はケトン基、ホモセリンラクトン基が挙げられている。しかし、システイン残基をはじめ上述の官能基は、タンパク質中での含量が大きいため、このような試薬を用いる文献8の方法では、試薬によって修飾されたタンパク質又はペプチドのマスマスペクトルが複雑となる。

また、文献8の方法においては、上記試薬によって修飾されたタンパク質又はペプチドは、親和性標識Aの捕捉試薬CRに対する選択的結合によって親和性単離法(例えばアフィニティークロマトグラフィー)によって単離される。すなわち、CRの種類に応じた特殊なカラムを用意しなければならない。

さらに、文献8の方法は、用いられる試薬の分子が大きく、このような試薬によってペプチドに大きなタグを付すことが、質量分析のフラグメンテーションによるペプチドの同定の正確さに影響するという問題がある。また、そのような大きい分子を得るための工程は煩雑である。

文献8の方法は、上述のような欠点があったため、それに代わる有用な方法の開発が望ま

れていた。本発明者らは、トリプトファン残基に注目し、本発明の方法の開発に至った。

トリプトファンはタンパク質を構成する20種類のアミノ酸の中で、タンパク質中で機能的な面で或いは活性面で非常に重要な役割をもつアミノ酸である。このため、トリプトファンをターゲットとする本件請求の範囲32に係る発明は、タンパク質の機能解析を行うために非常に有効な手段となる。

また、トリプトファンは様々な種類のタンパク質中に広く分布し、90%以上のタンパク質中に構成アミノ酸残基として含まれている。このため、本件請求の範囲32に係る発明は、タンパク質の網羅的解析を行うために非常に有効な手段となる。

さらに、本件請求の範囲32に係る発明においてターゲットとなるトリプトファン残基は、1つのタンパク質に含有される構成アミノ酸残基のうちで最も少ない含有率を有するアミノ酸残基である。文献8でターゲットとなるタンパク質中の構成アミノ酸残基のひとつであるシステインと比較すると、例えばアルブミン中には35個のシステイン残基が含まれるのに対してトリプトファン残基は1個しか含まれない。従って、本件請求の範囲32に係る発明においては、トリプトファン残基のラベル化試薬によって修飾されたタンパク質又はペプチドのマススペクトルの帰属が容易であり、且つ正確な解析が行うことができる。

本件請求の範囲32に係る発明においては、ラベル化されたペプチド断片がラベル化前よりも疎水性が増すため、文献8の方法で用いられるような特殊なカラムを用意する必要はなく、セファデックス系や逆相系のカラムを用いて濃縮・分離することが可能である。

本件請求の範囲32に係る発明においては、用いられるラベル化試薬の分子量が小さくシンプルであるため、ラベル化されたペプチド断片を質量分析計で測定する際にラベル化試薬部分での不必要な開裂が起こらない。すなわち、本件請求の範囲32に係る発明においては、MS分析ではラベル化ペプチドが効率良くイオン化し、MS/MS分析では不必要なフラグメンテーションを抑えられる。このため、スペクトルが解析しやすく、かつ正確な解析が行うことができる。

このように、本発明では当業者に予測できない種々の格別な効果が得られる。

上述のことから、本件請求の範囲32の方法において用いられるラベル化試薬が、シンプルな化合物でありながら、質量分析によるタンパク質の定量解析のために必須となる上記3つの機能、すなわち、試薬が結合したペプチドを単離することを可能にする機能、同位体標

識されることによりペプチドの定量を行うことを可能にする機能、及び、選択的にタンパク質中の特定の部位をタグ化することを可能にする機能をすべて兼ね備えているという点、及びそれにより得られる予測できない格別な効果については、文献１－９のいずれにも何ら教示・示唆がない。従って、本件請求の範囲３２は進歩性を有する。

（４） 本件請求の範囲２０に係る発明は、「前記スルフェニル化合物が、２－ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、４－ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、２，４－ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び２－ニトロ－４－カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれるラベル化試薬。」である。本件請求の範囲２０のラベル化試薬は、前記請求の範囲３２の方法において有用に用いることができるため、進歩性を有する。

（５） 本件請求の範囲１０に係る発明は、「２－ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、４－ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、２，４－ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び２－ニトロ－４－カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれるスルフェニル化合物。」である。本件請求の範囲１０のスルフェニル化合物は、前記請求の範囲２０のラベル化試薬として有用に用いることができるため、進歩性を有する。

（６） 本件請求の範囲３２の方法、及び本件請求の範囲２０のラベル化試薬についての論文は、添付の参考文献１（RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY 2003; 17: 1642-1650）に記載されている。すなわち、これらの発明は学術的にもその価値が認められている。このことから、本件請求の範囲３２に係る発明、及び本件請求の範囲２０に係る発明は、進歩性を有しているものと確信する。なお、参考文献２（島津評論 第６０巻 第１・２号）は、参考文献１とほぼ同一内容を開示する日本語文献である。

（７） 以上の次第で、少なくとも本件請求項１０、２０及び３２は、進歩性を有していると思料いたします。何卒、ご再考のほど、宜しくお願い申し上げます。

以 上

6. 添付書類の目録

1. 参考文献 1 九山浩樹 (Hiroki Kuyama)、渡辺真 (Makoto Watanabe)、戸田千香子 (Chikako Toda)、安藤英治 (Eiji Ando)、田中耕一 (Koichi Tanaka) 及び西村紀 (Osamu Nishimura) 著、トリプトファン残基のラベル化による定量的プロテオーム解析法 (An Approach to Quantitative Proteome Analysis by Labeling Tryptophan Residues)、「ラピッド・コミュニケーションズ・イン・マス・スペクトロメトリー (Rapid Communications in Mass Spectrometry)」、2003年、第17巻、p. 1642-1650

2. 参考文献 2 九山浩樹、渡辺真、戸田千香子、松尾英一、安藤英治、西根勤、田中耕一及び西村紀著、トリプトファン残基のラベル化による定量的プロテオーム解析法、「島津評論」、2003年、第60巻 第1・2号